



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : C07F 9/30, A61K 31/66, C07F 9/572, 9/6558, A61P 35/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/43404 (43) Date de publication internationale: 27 juillet 2000 (27.07.00)
---	-----------	--

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR00/00093

(22) Date de dépôt international: 18 janvier 2000 (18.01.00)

(30) Données relatives à la priorité:
99/00509 19 janvier 1999 (19.01.99) FR

(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR]; 31-33, Rue De La Fédération, F-75752 Paris 15ème (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE [FR/FR]; 101, Rue De Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, Rue Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR). BASSET, Geneviève (représentante légale de l'inventeur décédé) [FR/FR]; 1 rue de Campagnol, F-67200 Oberhausbergen (FR).

(72) Inventeur: BASSET, Paul (décédé).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): DIVE, Vincent [FR/FR]; 25-29, Avenue Joffre, F-94160 St Mande (FR). CUNIASSE, Philippe [FR/FR]; 361, Rue Des Pyrénées, F-75020 Paris (FR). RIO, Marie-Christine [FR/FR]; 5

Rue De L'Argile, F-67400 Hillkirch (FR). YOTAKIS, Athanasios [GR/GR]; 7 Rue Parasidou, 15342 Ag Paraskevi (GR). BEAU, Fabrice [FR/FR]; 76 Rue De L'Effort Mutuel, F-91300 Massy (FR). VASSILIOU, Stamatia [GR/GR]; Sarantaporou, 18 Kareas, 16233 Athenes (GR).

(74) Mandataire: DES TERMES, Monique; Brevatome, 3, Rue Du Docteur Lancereaux, F-75008 Paris (FR).

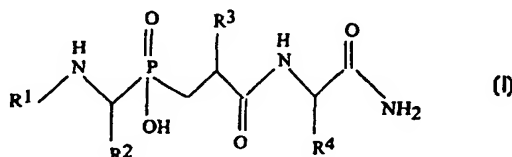
(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: PHOSPHINIC PSEUDOPEPTIDES INHIBITORS OF MATRIX METALLOPROTEASES

(54) Titre: PSEUDO-PEPTIDES PHOSPHINIQUES INHIBITEURS DES METALLOPROTEASES MATRICIELLES



(57) Abstract

The invention concerns phosphinic pseudopeptides of formula (I) wherein: R¹ is a group blocking an amine function, or a residue of amino acid or of a peptide with blocked amino end; R² represents the side-chain of a natural or non-natural amino acid; R³ represents: 1) the side-chain of a natural amino acid except Gly and Ala, non-substituted or substituted by an aryl group; 2) an aralkyl group; or 3) an alkyl group of at least 3 carbon atoms; and R⁴ represents a side-chain of a natural or non-natural amino acid. Said pseudopeptides are useful as inhibitors of zinc matrix metalloproteases, in particular for cancer treatment.

(57) Abrégé

L'invention concerne des pseudo-peptides phosphiniques de formule (I) dans laquelle R¹ est un groupe bloquant une fonction amine, ou un résidu d'acide aminé ou de peptide à fonction amine terminale bloquée, R² représente la chaîne latérale d'un acide aminé naturel ou non naturel, R³ représente: 1) la chaîne latérale d'un acide aminé naturel sauf Gly et Ala, non substituée ou substituée par un groupe aryle, 2) un groupe aralkyle, ou 3) un groupe alkyle d'au moins 3 atomes de carbone, et R⁴ représente une chaîne latérale d'acide aminé naturel ou non naturel. Ils sont utiles comme inhibiteurs de métalloprotéases à zinc matricielles, en particulier pour le traitement du cancer.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce		de Macédoine	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PL	Pologne		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	PT	Portugal		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SD	Soudan		
DK	Danemark	LR	Libéria	SE	Suède		
EE	Estonie			SG	Singapour		

PSEUDO-PEPTIDES PHOSPHINIQUES INHIBITEURS DES METALLOPROTEASES MATRICIELLES

Domaine technique

5 La présente invention a pour objet des
pseudo-peptides phosphiniques, utilisables en
particulier comme inhibiteurs très puissants et
spécifiques des métalloprotéases à zinc matricielles
(MMP), en particulier les MMP-11, MMP-2, MMP-9 et MMP-
10 8. En revanche, ces pseudo-peptides apparaissent très
peu actifs vis à vis des MMP-1 et MMP-7. Ainsi, ces
inhibiteurs offrent la possibilité de ne bloquer in
vivo qu'une sous-famille de MMP, et pourraient donc à
cet égard s'avérer être moins toxiques que des
15 inhibiteurs de MMP à très large spectre d'activité.

Ces pseudo-peptides peuvent avoir des applications
dans le traitement de maladies caractérisées par la
sur-expression des protéases matricielles, telles que
la dégénérescence des tissus conjonctifs et
20 articulaires, les arthrites rhumatoïdes, les ostéo-
arthrites, l'anévrisme aortique et le cancer.

Sur la base d'études réalisées in vivo chez
l'animal, ces inhibiteurs phosphiniques apparaissent
pouvoir être utilisés dans des compositions
25 pharmaceutiques pour bloquer la croissance de tumeurs
primaires ou secondaires.

Etat de la technique antérieure

Les métalloprotéases à zinc matricielles (MMP) représentent une famille d'enzymes capables collectivement de cliver l'ensemble des protéines de la matrice extracellulaire. Du fait de leur rôle sur les protéines de la matrice extracellulaire, ces enzymes jouent un rôle très important lors du développement et au cours de différents processus de remodelage tissulaire, tels que l'involution de la glande mammaire, la cicatrisation et l'extravasation de cellules spécialisées de la réponse immunitaire.

On connaît aujourd'hui chez l'homme une quinzaine d'enzymes appartenant à la famille des MMP :

15

Matrixines	
MMP-1	Collagénase interstitielle
MMP-8	Collagénase de neutrophile
MMP-13	Collagénase 3
MMP-18	Collagénase 4
MMP-3	Stromélysine 1
MMP-10	Stromélysine-2
MMP-11	Stromélysine-3
MMP-2	Gélatinase-A
MMP-9	Gélatinase-B
MMP-12	Métalloélastase
MMP-14	MT-1 MMP
MMP-15	MT-2 MMP
MMP-16	MT-3 MMP
MMP-17	MT-4 MMP
MMP-7	Matrilysine

Les collagénases apparaissent comme les seules MMP à être capables de cliver le collagène sous forme fibrillaire. Les gélatinases A et B se caractérisent par leur capacité à cliver du collagène de type IV, très abondant au niveau des membranes

20

basales et du collagène sous forme dénaturée. Les stromélysines 1 et 2 seraient responsables de la dégradation d'autres protéines de la matrice extracellulaire, comme la fibronectine et différentes
5 protéoglycanes. Les MT-MMP seraient surtout impliquées dans l'activation de la gélatinase A, et du fait de leur localisation membranaire, ces matrixines joueraient le rôle de récepteur membranaire de la gélatinase A. Il est à noter que le substrat
10 physiologique de la stromélysine-3 n'est toujours pas connu. Néanmoins, plusieurs travaux sur cette protéase, qui a été initialement caractérisée dans des tumeurs du sein, suggèrent que la stromélysine-3 est un facteur important du développement et de la survie des tumeurs.

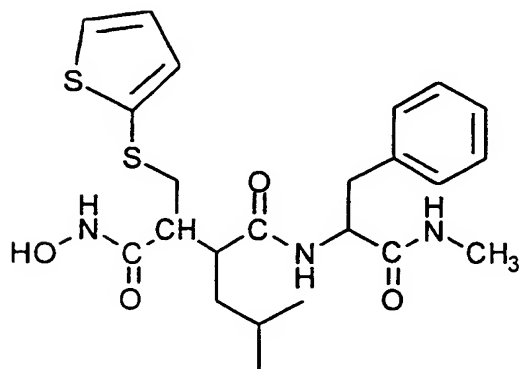
15 Les MMP apparaissent sur-exprimées dans différentes pathologies chez l'homme, notamment le cancer. Dans cette pathologie, le rôle des MMP a longtemps été associé à l'invasion des cellules tumorales et à leur capacité à franchir différentes
20 barrières pour former des tumeurs secondaires. Plus récemment, différentes études ont établi que ces protéases jouent certainement un rôle plus fondamental dans la cancérogénèse, en participant notamment à la croissance des tumeurs primaires. Parmi différentes
25 hypothèses pour expliquer cette fonction des MMP, les plus étudiées concernent leur rôle dans :

- leur capacité à pouvoir, par protéolyse de protéines de la matrice extracellualire, libérer de cette matrice des facteurs de croissance indispensables
30 au développement et à la survie des tumeurs, et
- l'angiogénèse, nécessaire à la croissance des tumeurs.

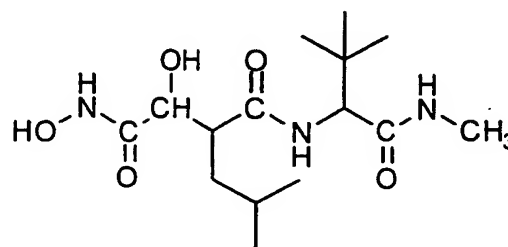
L'implication apparente des MMP dans la croissance des tumeurs a conduit de nombreuses équipes dans le monde à s'intéresser au rôle de composés capables d'inhiber ces enzymes.

5 Des programmes de synthèse sur les inhibiteurs de MMP ont été initiés depuis de nombreuses années. A cette époque, les applications sur les inhibiteurs de MMP visaient surtout les maladies inflammatoires des tissus conjonctifs. Ce n'est que
10 plus récemment que de multiples programmes sur l'application des inhibiteurs de MMP en cancérologie se sont développés, comme il est décrit par Brown, Medical Oncology, 1997, 14, 1-10, [1]. En effet, comme rappelé ci-dessus, les travaux démontrant que les MMP doivent
15 être considérées comme des cibles privilégiées pour développer de nouveaux agents anti-cancéreux sont relativement récents. A cet égard, on peut noter que pour l'année 1997, 67 brevets concernant la synthèse d'inhibiteurs de MMP ont été déposés dans le monde,
20 dont la majorité concerne des applications en cancérologie, comme il est décrit par Beckett et al, 1998, Exp. Opin. Ther. Patents, 8, p.259-289 [2]. Dans la plupart de ces brevets, les composés synthétisés appartiennent à la famille des dérivés pseudo-peptidiques comportant une fonction hydroxamate.
25 Quelques brevets concernent des composés pseudo-peptidiques possédant des fonctions carboxyl-alkyle ou thiol. Dans ces composés, les fonctions hydroxamate, thiol ou carboxyl-alkyle interagissent avec l'atome de
30 zinc présent dans le site actif des MMP. Les composés les plus avancés pour leur activité anticancéreuse ont été développés par la firme British Biotechnology. Deux composés, le Batismatat BB94 et le Marimastat ont fait

l'objet d'études cliniques en phases II et III chez l'homme. Depuis, il apparaît que d'autres firmes (Roche, Bayer, Agouron, Novartis) ont conduit des études cliniques en phases I et II sur des inhibiteurs de MMP en cancérologie.



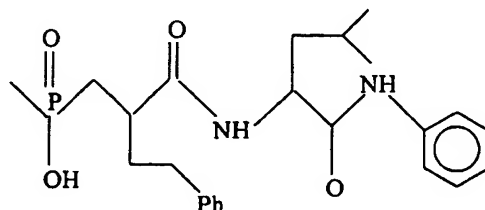
Batimastat, BB94



Marimastat

Ainsi, aucun des composés susceptibles d'inhiber les MMP connus par les références [1] et [2], n'est constitué par un pseudopeptide phosphinique.

Le document : Goulet et al, Bioorg. Med. Chem. Lett. 4, 1994, p. 1221-1224 [3], décrit toutefois des pseudo-peptides phosphiniques utilisables comme inhibiteur sélectif de la stromélysine-1 (MMP-3), qui comportent la séquence finale :



Caldwell et al, Bioorg. Med. Chem. Letter 6, 1996, p.323-328 [4], décrivent également un pseudo-peptide phosphinique qui est un inhibiteur sélectif de la stromélysine-1 (MMP-3), qui comporte la même
5 séquence terminale que le pseudo-peptide de la référence [3].

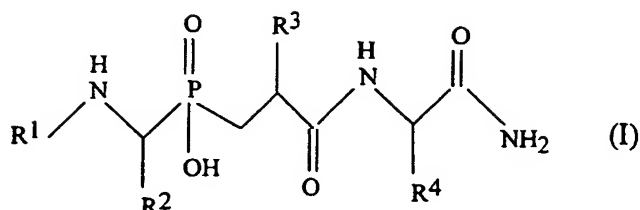
Dans ces références [3] et [4], on recherche une activité vis-à-vis de la MMP-3, alors que dans l'invention, on recherche une activité sélective
10 vis-à-vis des MMP-11, MMP-2, MMP-9 et MMP-8. On remarque d'autre part que dans la présente invention, R^3 n'est pas seulement un résidu phényléthyle. Qui plus est, l'invention démontre que d'autres substituants dans cette position donnent des composés au pouvoir
15 inhibiteur renforcé.

Les documents FR-A- 2 676 059 [5], FR-A-2 689 764 [6] et EP-A-0 725 075(7) illustrent des pseudo-peptides phosphiniques présentant une activité inhibitrice vis-à-vis des collagénases bactériennes et
20 des endopeptidases à zinc 24.15 et 24.16.

La présente invention a précisément pour objet des nouveaux pseudo-peptides phosphiniques présentant une activité inhibitrice puissante et spécifique vis-à-vis des métallo-protéases à zinc
25 matricielles MMP-11, MMP-2, MMP-9 et MMP-8.

Exposé de l'invention

Selon l'invention, le pseudo-peptide phosphinique répond à la formule :



dans laquelle

- R^1 est un groupe bloquant une fonction amine, ou un résidu d'acide aminé ou de peptide à fonction amino terminale bloquée,
- R^2 représente la chaîne latérale d'un acide aminé naturel ou non naturel,
- R^3 représente :

1) la chaîne latérale d'un acide aminé naturel sauf Gly et Ala, non substituée ou substituée par un groupe aryle,

2) un groupe aralkyle, ou

3) un groupe alkyle d'au moins 3 atomes de carbone, et

- R^4 représente une chaîne latérale d'acide aminé naturel ou non naturel, ou un groupe dinitrobenzyle.

Ce pseudo-peptide de formule (I) est un pseudo-tripeptide possédant un groupement chimique de type phosphinique qui a pour fonction de chélater l'atome de zinc des MMP. Dans ce pseudo-tripeptide, le choix des groupes R^2 , R^3 et R^4 permet d'assurer l'interaction du tripeptide respectivement avec les sous-sites S1, S1' et S2' des MMP. Le groupe R^1 est supposé interagir à la jonction des sous-sites S3/S2.

Dans la définition donnée ci-dessus des pseudo-peptides de l'invention, les termes « acide aminé » utilisés pour R^1 , R^2 , R^3 et R^4 dans [5] se rapportent aux vingt α -acides aminés communément trouvés dans les protéines qui sont également connus sous le nom d'acides aminés standard et à leurs

analogues. Les chaînes latérales de ces aminoacides comprennent des groupes alkyle linéaires et ramifiés, hydroxyalkyle, carboxyalkyle, aralkyle, aminoalkyle, carboxamide alkyle, mercapto alkyle, phénylalkyle, hydroxyphénylalkyle, guanidinoalkyle, imidazoylealkyle, indolylealkyle, et pyrrolidinyle.

A titre d'exemple d'acides aminés utilisables, on peut citer l'alanine, l'arginine, l'asparagine, l'acide aspartique, la cystéine, la glutamine, l'acide glutamique, la glycine, l'histidine, l'isoleucine, la leucine, la norleucine, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la proline, l'hydroxyproline, la sérine, la thréonine, le tryptophane, la tyrosine, la valine, la nitrophénylalanine, l'homo arginine, la thiazolidine et la déshydroproline.

Toutefois, et dans le cas de R^3 , l'acide aminé ne peut être Gly ou Ala car ceux-ci ne présentent pas une interaction suffisante avec le sous site S1' des MMP.

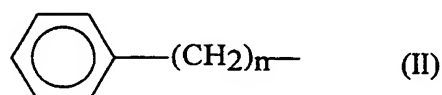
De préférence, l'acide aminé utilisé pour R^3 est choisi parmi Phe, Leu ou bien des résidus Ser, Cys dont la chaîne latérale est substituée par un groupe arylalkyle.

Les groupes aryle susceptibles d'être utilisés sont ceux dérivés d'un noyau aromatique monocyclique ou polycyclique, éventuellement substitué par des groupes alkyle ou alcoxy. A titre d'exemples de groupes aryle utilisables, on peut citer les groupes phényle, naphtyle, benzyle et alcoxybenzyle tel que p-méthoxybenzyle.

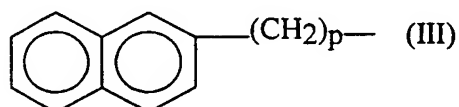
R^3 peut encore représenter un groupe aralkyle. Dans ce groupe aralkyle, le groupe aryle peut

être l'un de ceux mentionnés ci-dessus. La partie alkyle du groupe aralkyle peut être une chaîne linéaire ou ramifiée de 1 à 6 atomes de carbone.

A titre d'exemple de groupes aralkyle utilisables, on peut citer les groupes de formules :



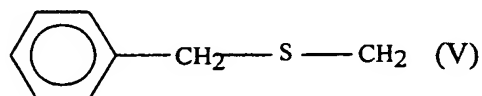
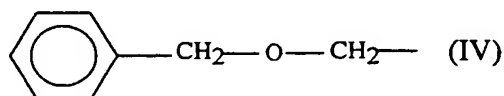
avec n étant un nombre entier de 1 à 4, et

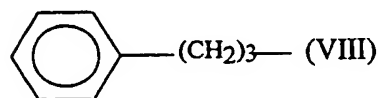
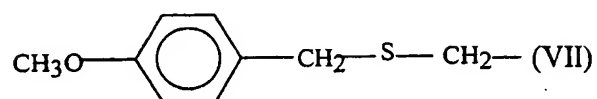


avec p étant égal à 1 ou 2.

Les groupes alkyle utilisables pour R^3 ont au moins 3 atomes de carbone. Ils peuvent être linéaires ou ramifiés et ont de préférence au plus 7 atomes de carbone. A titre d'exemple de groupes alkyle utilisables, on peut citer les groupes $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_6-$ et $(\text{CH}_3)_2-\text{CH}-\text{CH}_2-$.

De préférence, R^3 représente un groupe répondant à l'une des formules suivantes :





Selon l'invention, R^2 est choisi de façon à
 5 interagir avec le sous-site S1 des MMP. De bons
 résultats sont obtenus lorsque R^2 représente le groupe
 méthyle ou benzyle ; de préférence R^2 est le groupe
 benzyle, ce qui correspond à la chaîne latérale de Phe.

Selon l'invention, R^4 est choisi de façon à
 10 interagir avec le sous-site S2' des MMP. De bons
 résultats sont obtenus lorsque R^4 représente la chaîne
 latérale de Trp ou un groupe dinitrobenzyle (Dpa).

Dans le pseudo-peptide de l'invention, les
 chaînes latérales R^2 , R^3 et R^4 des acides aminés peuvent
 15 être sous forme L ou D. Aussi, le pseudo-peptide peut
 être constitué par un seul isomère ou par un mélange de
 4-diaстéroisomères provenant de la présence de deux
 centre asymétriques au niveau des carbone α portant les
 résidus R^2 et R^3 . Bien que toute configuration des
 20 acides aminés puisse convenir, il est préférable que le
 groupe R^4 soit sous forme L.

En revanche, trois sur quatre
 diastéroisomères correspondant aux différentes
 configurations de R^2 et R^3 ont des activités
 25 pratiquement équivalentes comme inhibiteurs des MMP.

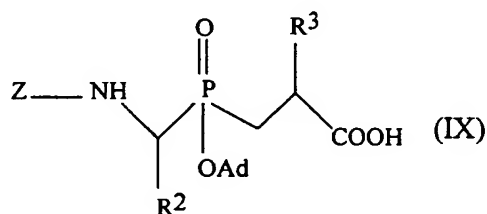
Dans les pseudo-peptides de l'invention, R^1
 peut représenter divers groupements dont la nature

influence l'affinité du pseudo-peptide vis-à-vis des différentes MMP.

R^1 peut représenter un « groupe bloquant une fonction amine ». Ces termes incluent tous les groupes bloquants utilisables pour bloquer les fonctions amines d'acides aminés et de peptides, par exemple les groupes t-butoxy-carbonyl, benzyloxycarbonyl, cinnamoyl, pivaloyl et N-(1-fluorényl-méthoxycarbonyl) Fmoc.

R^1 peut aussi représenter des groupes bloquants choisis parmi les groupes acétyl, benzyloxyacétyl, phénylaminoacétyl, (m-chlorophényl)aminoacétyl, (2-hydroxy-5-chloro-phényl)aminoacétyl, indolyl-2-carbonyl, 4,6-dichloro-indolyl-2-carbonyl, quinolyl-2-carbonyl et 1-oxa-2,4-dichloro-7-naphtalène carbonyl, ou encore un résidu d'acide aminé ou de peptide dont la fonction amine terminale est bloquée par un groupe approprié. A titre d'exemple de tels résidus, on peut citer les groupes Z-Ala et Z-Leu dans lesquels Z représente le groupe benzyloxycarbonyl.

Les pseudo-peptides de l'invention peuvent être préparés par des procédés classiques à partir des blocs phosphiniques de formule :

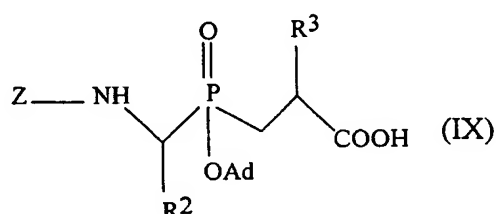


25

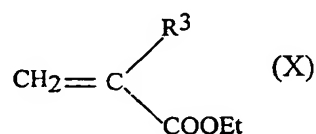
dans laquelle Z représente le groupe benzyloxycarbonyl et Ad le groupe adamantyle, et de l'acide aminé correspondant à R^4 par synthèse chimique en phase

solide selon les procédés décrits par Yotakis et al, J. Org. Chem., 1996, 61, page 6601-6605 [8] et Jiracek et al, J. Biol. Chem., 1995, 270, p. 21701-21706 [9] et J. Biol. Chem., 1996, 271, p. 19606-19611 [10].

- 5 Les blocs phosphiniques de départ peuvent être obtenus par addition de Michael d'un acide phosphinique porteur du groupe R²



- 10 sur un acrylate fournissant le groupe R³



avec Et représentant le groupe éthyle.

- 15 Les acrylates fournissant le groupe R³ peuvent être synthétisés par différentes voies, comme on le verra ci-après.

Les pseudo-peptide de l'invention peuvent être utilisés pour le traitement de maladies mettant en jeu une surexpression des métalloprotéases à zinc

20 matricielles.

Aussi, l'invention a encore pour objet une composition pharmaceutique inhibant au moins une métalloprotéase à zinc matricielle, comprenant au moins un pseudo-peptide de formule (I) tel que défini ci-

25 dessus.

De préférence, cette composition inhibe une métalloprotéase à zinc matricielle choisie parmi les MMP-2, MMP-8, MMP-9 et MMP-11.

5 Cette composition est destinée au traitement d'une maladie caractérisée par la surexpression des protéases matricielles, telles que le cancer.

10 L'invention concerne aussi l'utilisation d'un pseudo-peptide phosphinique de formule (I) tel que défini ci-dessus, pour la fabrication d'un médicament inhibant au moins une métalloprotéase à zinc matricielle, en particulier les MMP-2, MMP-8, MMP-9 et MMP-11.

15 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront mieux à la lecture de la description qui suit, donnée bien entendu à titre illustratif et non limitatif, en référence aux dessins annexés.

Brève description des dessins

20 La figure 1 est un schéma de synthèse de pseudo-peptides conformes à l'invention.

La figure 2 est un diagramme illustrant l'efficacité anti-tumorale d'un composé de l'invention, qui donne le volume moyen de la tumeur (en mm^3) en
25 fonction du temps (en jours) après l'injection des cellules cancéreuses sur des souris témoins et des souris traitées par le pseudo-peptide de l'invention.

Exposé détaillé des modes de réalisation

Les exemples 1 à 27 qui suivent, illustrent la fabrication de pseudo-peptides conformes à l'invention.

Sur la figure 1, on a représenté le schéma de synthèse des pseudo-peptides de l'invention, qui met en jeu une première réaction pour la fabrication de blocs phosphiniques 3 à partir d'un acide phosphinique 1 porteur du groupe R^2 et d'un acrylate 2 fournissant le groupe R^3 , par addition de Michael.

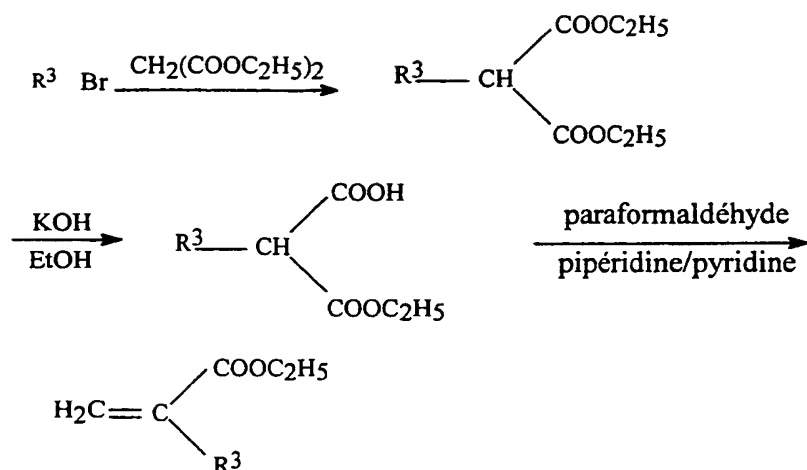
Après formation du bloc phosphinique 3, on introduit un groupe adamantyle sur la fonction hydroxyphosphinyle du bloc 4, puis on élimine la fonction ester C-terminale 5, et on effectue une synthèse en phase solide du pseudo-peptide par addition de l'acide aminé souhaité 6 sur la fonction acide C-terminale.

Sur cette figure 2 représente le groupe benzyloxycarbonyle.

Exemples 1 à 5

Ces exemples illustrent la préparation d'acrylates 2 comportant un groupe R^3 avec CH_2 terminal par le procédé suivant :

Voie A :

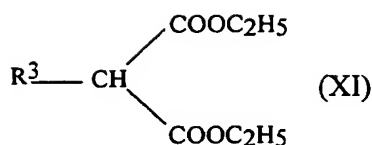


Cette synthèse correspond au procédé décrit
 5 par Eistetter et al dans J. Med. Chem., 25, p109-113,
 1982 [11].

On décrit ci-après cette synthèse dans le
 cas où R^3 représente les groupes illustrés dans le
 tableau 1.

10 A une solution d'éthoxyde de sodium
 (10 mmol de sodium dans 11 ml d'éthanol absolu), on
 ajoute sur une période de 10 minutes, 10 mmol de
 malonate de diéthyle. On soumet la solution à une
 agitation à 50°C, pendant 1 heure, puis on y ajoute
 15 goutte à goutte 10 mmol du bromure requis. On soumet le
 mélange à une agitation pendant 6 heures à 50°C, puis
 on élimine l'éthanol sous vide et on ajoute de l'éther
 diéthylique. On lave cette solution avec de l'eau, de
 la saumure et on sèche sur Na_2SO_4 , puis on concentre
 20 pour obtenir un résidu huileux, qui après distillation
 donne le diester de formule :

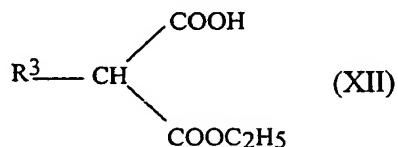
16



avec des rendements de 40 à 65 %.

A une solution de 10 mmol de diester dans 8 ml d'éthanol, on ajoute une solution de KOH (10 mmol) dans 8 ml d'éthanol, on agite le mélange pendant 16 heures. Après évaporation du solvant organique, on traite le résidu avec de l'eau et on l'extrait avec de l'éther diéthylique.

On acidifie la phase aqueuse avec HCl6N et on l'extrait 2 fois avec de l'éther diéthylique. On sèche les phases organiques sur Na₂SO₄ et on les évapore pour obtenir les monoesters de formule :



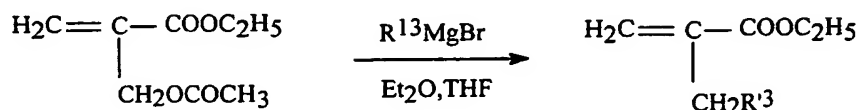
avec des rendements de 65 à 90 %.

A une solution du monoester dans 0,8 ml de pyridine et 0,05 ml de pipéridine, on ajoute 6 mmol de paraformaldéhyde, puis on soumet le mélange à une agitation et à un chauffage à 50-55°C pendant 3 heures. Après addition d'éther diéthylique, on lave la phase organique avec de l'eau et HCl3N, puis on sèche sur Na₂SO₄, et on concentre pour obtenir les composés 2a à 2c du tableau avec les rendements indiqués dans ce tableau.

Les points de fusion des acrylates 2a à 2e obtenus sont également donnés dans le tableau 1.

Exemple 6

Dans cet exemple où R^3 représente $CH_2R'^3$, on réalise la synthèse de l'acrylate selon la voie de synthèse suivante :

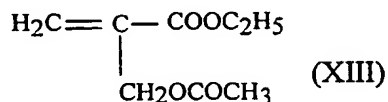
Voie B :

5

Dans cet exemple, on utilise cette voie de synthèse pour préparer l'acrylate 2 dans lequel R^3 représente le groupe $CH_3(CH_2)_6$, soit $R'^3 = CH_3-(CH_2)_5$. Sous atmosphère d'argon, on ajoute goutte à goutte une solution de bromure d'hexyle $CH_3(CH_2)_5Br$ (1,65 g, 10 mmol) dans 15 ml d'éther diéthylique absolu à un flacon contenant 0,22 g (11 mmol) de magnésium et de l'iode I_2 (catalytique) sur une période de 90 minutes.

On porte le mélange réactionnel au reflux pendant 1 heure. Après addition de 0,18 mmol de CuI , on fait décroître la température du mélange à -78°C .

On ajoute alors lentement une solution de 1,15 g (6,7 mmol) du composé :



20

dans 10 ml de $Et_2O : THF$. On agite le mélange pendant 30 minutes à la température ambiante. Après traitement du mélange avec HCl 0,5N, $NaHCO_3$ 5 % et de l'eau, on sèche la couche organique sur Na_2SO_4 . On élimine le

25

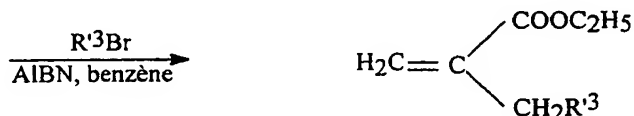
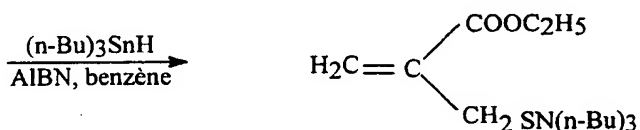
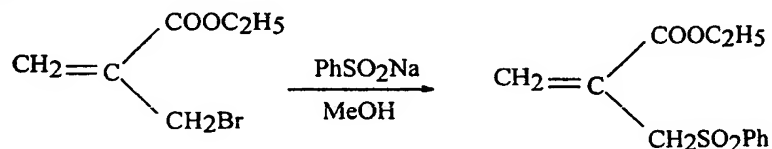
solvant sous vide et on purifie le résidu obtenu par chromatographie sur colonne en utilisant comme éluant un mélange d'éther de pétrole 40 à 60°C/éther (13 : 1). On obtient ainsi le composé **2f** avec un rendement de 40 %. Les caractéristiques du composé **2f** sont données dans le tableau 1.

Exemple 7

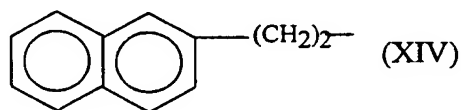
Dans cet exemple, on prépare un acrylate **2** avec $R_3 = R'^3-CH_2-$ en utilisant le procédé décrit par Baldwin et al J. Chem. Soc. Chem. Comm. 1986, p 1339-1340, [12].

Ceci correspond au schéma réactionnel suivant :

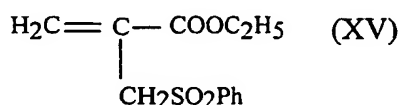
Voie C :



Ce procédé est utilisé pour préparer l'acrylate **2g** dans lequel R^3 représente le groupe de formule :

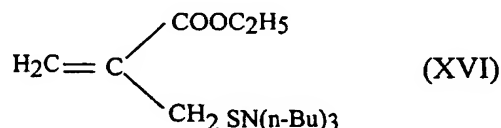


On porte au reflux pendant 12 heures un mélange de 1,9 g (10 mmol) de bromométhyl acrylate d'éthyle et de 3,3 g (20 mmol) du sel de sodium de l'acide benzène sulfinique dans 40 ml de méthanol. On élimine le solvant et on ajoute de l'éther diéthylique. On lave la solution avec de l'eau, de la saumure, on sèche sur Na₂SO₄ et on concentre pour obtenir 2 grammes d'acrylate sulfinique



sous forme d'huile, avec un rendement de 80 %.

A un mélange de 2 g (8 mmol) d'acrylate sulfinique dans 40 ml de benzène sec, on ajoute 4,7 g (16,4 mmol) d'hydruure de tri-n-butyl étain et 0,15 g (0,96 mmol) de 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN). On porte le mélange au reflux pendant 1,5 heure, puis on ajoute de l'eau et on sèche la couche organique extraite sur Na₂SO₄ et on la concentre. On purifie le produit brut par chromatographie sur colonne, en utilisant comme éluant l'éther de pétrole (40 à 60°C)/éther (9 : 1). On obtient 2,9 g d'alkylstannane



avec un rendement de 90 %.

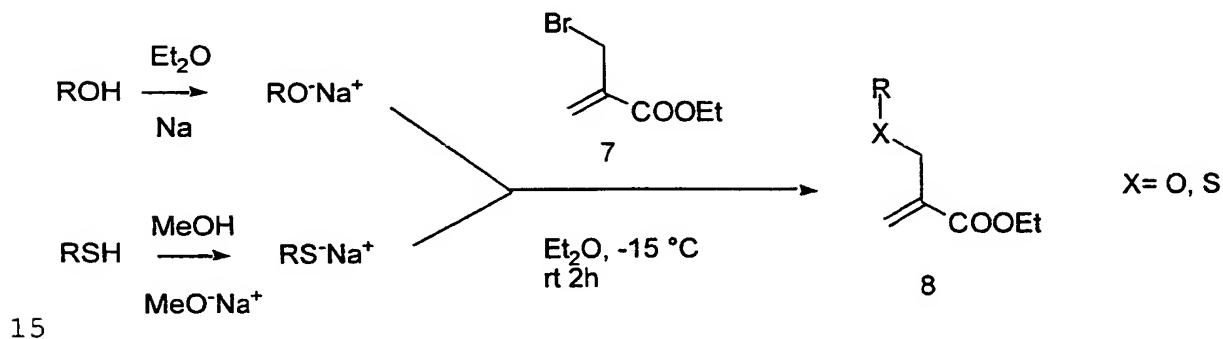
On dissout dans 10 ml de benzène sec 1,47 g (3,6 mmol) d'alkylstannane et 0,39 g (1,8 mmol) de 2-bromoéthyl naphtalène. Après addition de 0,064 g (0,39 mmol) de AIBN, on porte le mélange réactionnel au reflux pendant 2 heures. Après addition d'eau, on sépare la phase organique, on la lave avec de l'eau, on

la sèche sur Na_2SO_4 et on la concentre à siccité. On obtient ainsi 0,06 g de l'acrylate **2g** donné dans le tableau 1, avec un rendement de 13 %, après purification du résidu sur colonne de chromatographie en utilisant l'éther de pétrole (40 à 60°C)/éther (9 : 1) comme éluant.

Exemples 8 et 9

Dans ces exemples, on prépare un acrylate **2** dans lequel R^3 comporte un atome de soufre ou un atome d'oxygène, en suivant le schéma de synthèse suivant :

Voie D :



Dans ce schéma, R^3 correspond à $\text{RX}-\text{CH}_2$ avec $\text{X} = \text{S}$ ou O .

On utilise ce procédé pour préparer les acrylates **2h** et **2i** dans lesquels R^3 représente respectivement le groupe paraméthoxybenzylthiométhyle et le groupe benzylthiométhyle.

On ajoute goutte à goutte une solution de 10 mmol du thiol approprié $\text{R}-\text{SH}$ dans 15 ml de méthanol à une solution agitée refroidie dans un bain de glace de 9 mmol de sodium dans 20 ml de méthanol sur une

période de 30 minutes. Après addition du thiol, on concentre le mélange à sec et on ajoute de l'éther diéthylique. On refroidit le sel qui précipite dans un bain de glace. On filtre le produit, on le lave avec

5 Et₂O froid et on le sèche sur P₂O₅ pour obtenir le sel de sodium avec un rendement de 85 à 95 %. A un mélange de 10 mmol de sel de sodium en suspension dans 40 ml de Et₂O sec et refroidi dans un bain de glace, on ajoute

10 goutte à goutte, sur une période de 45 minutes, une solution de bromométhacrylate d'éthyle (9 mmol) dans 20 ml d'éther diéthylique. On agite la solution pendant 30 minutes à 0°C et pendant 1 à 2 heures à la température ambiante. On dilue le mélange réactionnel avec 20 ml d'eau et on lave la couche organique avec de

15 l'eau, puis on la sèche sur Na₂SO₄ et on évapore. On purifie les composés **2h** et **2i** ainsi obtenus par chromatographie sur colonne, en utilisant comme éluant de l'éther de pétrole (40-60°C)/Et₂O (8 : 2).

Les rendements sont donnés dans le tableau

20 2.

Exemple 10

Dans cet exemple, on prépare l'acrylate **2j** dans lequel R³ correspond à ROCH₂ et représente le

25 groupe de formule C₆H₄—CH₂—O—CH₂, en suivant le schéma réactionnel illustré ci-dessus, avec R OH.

Dans un flacon bien sec, on ajoute des petits morceaux de sodium (10 mmol) à 20 ml d'éther diéthylique sec. On ajoute à ce mélange réactionnel,

30 une solution de 10 mmol d'alcool benzylique dans 10 ml d'éther diéthylique sur une période de 2 heures, sous un reflux modéré. On porte le mélange au reflux pendant

6 heures supplémentaires. On refroidit dans un bain de glace le précipité blanc obtenu, puis on filtre, on lave avec de l'éther diéthylique sec et froid et on sèche sur P_2O_5 pour obtenir le sel de sodium avec un
5 rendement de 85 à 95 %.

La réaction de ce sel avec le bromométhacrylate d'éthyle et la purification du composé obtenu sont effectués comme il est décrit dans l'exemple 8.

10 L'acrylate 2j obtenu est répertorié dans le tableau 2

Exemples 11 à 21

Dans ces exemples, on prépare des blocs
15 phosphiniques 3 avec R^2 et R^3 donnés dans le tableau 3, en utilisant la procédure décrite par Yiotakis et al, J. Org. Chem. 61, 1996, 6601-6605 [8].

Cette procédure comporte dans un premier temps la réaction de Michael décrite sur la figure 1.
20 L'acide phosphinique 1 de départ (figure 1) a été préparé selon le procédé décrit par Baylis et al, J. Chem. Soc. Perkin Trans I, 1984, p. 2845-2853 [13].

Les acrylates 2 ont été préparés dans les exemples 1 à 10. Pour la préparation des blocs
25 phosphiniques, on opère de la façon suivante.

On chauffe à 110°C , pendant 1 heure, sous atmosphère d'azote, une suspension de 1 mmol d'acide N-benzoyloxycarbonylphosphinique 1 et de 5 mmol d'hexaméthylidisilazane.

30 On ajoute ensuite goutte à goutte 1,3 mmol de l'acrylate 2 approprié, sur une durée de 15 minutes. On soumet le mélange réactionnel à une agitation pendant 3 heures supplémentaires à 110°C . On laisse

refroidir le mélange à 70°C et on ajoute goutte à goutte 3 ml d'éthanol. Après refroidissement à la température ambiante, on concentre le mélange réactionnel. On purifie le résidu par chromatographie sur colonne en utilisant comme éluant un mélange chloroforme/méthanol/acide acétique (7 : 0,5 : 0,5). On obtient ainsi les blocs phosphiniques **3a** à **3k** avec les rendements donnés dans le tableau 3.

Dans ce tableau, on a indiqué dans la colonne R³ quel acrylate **2** était utilisé pour la synthèse du bloc phosphinique. Le tableau 3 donne également le R_f des blocs obtenus.

Exemples 22 et 23.

Dans ces exemples, on synthétise les blocs phosphiniques **3l** et **3m** répondant aux formules données dans le tableau 3 de la façon suivante.

On ajoute 2,1 mmol de diisopropylamine et 2,1 mmol de chlorure de triméthylsilyle à une solution refroidie à la glace de 1 mmol d'acide phosphinique **1** dans 2 ml de chloroforme.

On soumet le mélange à une agitation à la température ambiante pendant 3 heures. Après refroidissement à 0°C, on ajoute 1,4 mmol de l'acrylate d'éthyle **2** approprié (**2e** ou **2g**), puis on agite le mélange réactionnel à la température ambiante pendant 16 heures. Après avoir ajouté goutte à goutte de l'alcool éthylique, on élimine les solvants sous vide. On obtient les composés **3l** ou **3m** du tableau 3 après une chromatographie sur colonne comme dans le cas des exemples 11 à 21.

Les rendements et les Rf des blocs obtenus sont donnés dans le tableau 3.

Les blocs **3b**, **3d** et **3e** à **3k** ont de plus été caractérisés par RMN du proton, du carbone 13 et du phosphore. Les résultats obtenus figurent en annexe.

Exemple 24

Dans cet exemple, on prépare les composés **4a** à **4m** de la figure 1 à partir des composés **3a** à **3m** en suivant le mode opératoire suivant.

On dissout dans 10 ml de chloroforme 1 mmol du composé **3a** à **3m** et 1,2 mmol de bromure de 1-adamantyle. On porte le mélange réactionnel au reflux. On ajoute ensuite 2 mmol d'oxyde d'argent en cinq parties égales, sur une période de 50 minutes. On porte la solution au reflux pendant 30 minutes supplémentaires. Après avoir éliminé les solvants, on traite le résidu avec de l'éther diéthylique et on filtre sur Célite. On concentre les filtrats. On purifie le résidu par chromatographie sur colonne en utilisant comme éluant le mélange chloroforme/isopropanol (9,8 : 0,2). On obtient ainsi les composés **4a** à **4m** avec les rendements indiqués dans le tableau 4, les Rf de ces composés sont également indiqués dans le tableau 4.

Exemple 25

Dans cet exemple, on suit le mode opératoire décrit sur la figure 1 pour transformer les composés **4a** à **4m** en composé **5a** à **5m**. Dans ce but, on opère de la façon suivante.

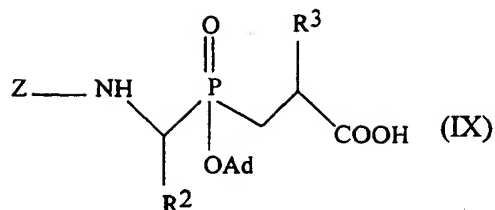
On ajoute goutte à goutte 1 ml de NaOH 4N à une solution agitée de 1 mmol du composé **4a** à **4m** dans

5,5 ml de méthanol. On agite le mélange réactionnel pendant 18 heures, puis on élimine le solvant. On dilue le résidu avec de l'eau, puis on l'acidifie avec HCl 0,5 N dans un bain de glace, on sèche sur Na₂SO₄ et on concentre pour obtenir les composés **5a** à **5m** sous forme de solide blanc, avec les rendements donnés dans le tableau 5. Les Rf de ces composés sont également donnés dans le tableau 5.

10 Exemple 26

Dans cet exemple, on prépare des pseudo-peptides phosphiniques dont les formules sont données dans les tableaux 5 à 7, à partir des blocs phosphiniques du tableau 4, par une synthèse en phase solide par chimie Fmoc (fluorénylméthoxycarbone), selon la procédure décrite par Yotakis et al, 1996, J. Org. Chem. 61, pages 6601-6605 [8] et Jiracek et al dans J. Biol. Chem., 1995, 270, pages 21701-21706 [9] et dans J. Biol. Chem., 1996, 271, pages 19606-19611 [10].

On réalise les couplages par la stratégie in situ en utilisant le 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium-hexafluorophosphate (HBTU)/diisopropyléthylamine. Les conditions de couplage sont les suivantes: trois équivalents de dérivé de Fmoc amino acide et 4 équivalents de diisopropyléthylamine dans le diméthylformamide sont ajoutés à la résine et laissés réagir pendant 30 min. Pour le couplage des blocs phosphiniques :



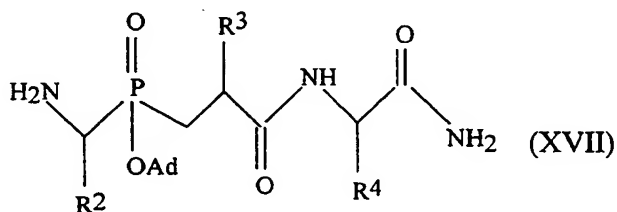
on utilise 1,5 équivalent de bloc.

Les conditions de clivages du groupe Fmoc sont 50 % de pipéridine dans le diméthylformamide pendant 30 minutes. Le groupe Fmoc est le (fluorémylméthoxy) carbonyle.

Exemple 27

Dans cet exemple, on réalise la synthèse des pseudo-peptides figurant dans le tableau 8 qui comportent des R^1 de nature différente. Les conditions d'introduction du groupe R^1 sont décrites ci-dessous, selon la nature de ce groupe.

Dans le cas où R^1 est un acide comportant un groupe indole ou quinoline (composés 30, 31, 32, 33 du tableau 8), le couplage de R^1 sur le peptide de formule générique

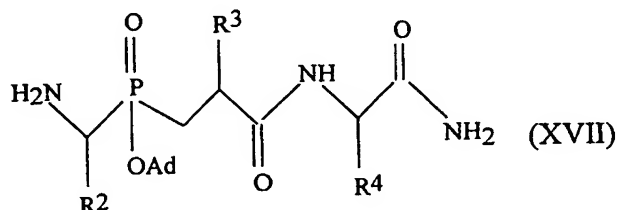


encore couplé à la résine, a été réalisé dans les conditions suivantes: 3 équivalents de l'acide dilué dans petit volume de N-méthyl-pyrrolidone, 3 équivalents de HBTU (0,4 M), 10 équivalents de diisopropyléthylamine (1,2 M), avec un temps de couplage de 45 min. L'incorporation du groupe R^1 est

suivie par un test de Kaiser. Lorsque nécessaire, cette opération a été répétée plusieurs fois, jusqu'à substitution complète de la fonction amine.

L'incorporation du groupe $R^1 = \text{Ph-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$ (composé 26) a été réalisée à partir du dérivé chloré correspondant avec les conditions suivantes: le dérivé chloré (25 équivalents, 0.5 M/dichlorométhane) et la diisopropyléthylamine (25 équivalents, 0,5 M/dichlorométhane) sont ajoutés sur la résine. La réaction d'acylation nécessite 1/2 h.

Pour la synthèse des composés 27, 28 et 29, le peptide



encore couplé à la résine, a été acylé tout d'abord avec le dérivé $\text{Br-CH}_2\text{-CO-Br}$ dans les conditions suivantes: le dérivé bromé (25 équivalents, 0,5 M/dichlorométhane) et la diisopropyléthylamine (25 équivalents, 0,5 M/dichlorométhane) sont ajoutés sur la résine, pour un temps de réaction de 1/2 h. La deuxième étape correspond à l'alkylation des dérivés d'aniline correspondants. Pour ce faire, le dérivé aniline (50 équivalents/DMSO) est ajouté à la résine, pour un temps de couplage de 2,5 h.

Le clivage des peptides de la résine, ainsi que d'hydrolyse des groupements protecteurs ont été réalisés à l'aide d'une solution d'acide trifluoroacétique contenant 2,5 % d'eau, 2,5 % de

thioanisol, 1,25% de thiophenol, 1,25 % d'éthanedithiol et 1,25% de triisopropylsilane.

Tous les peptides synthétisés dans les exemples 26 et 27 ont été purifiés par HPLC phase
5 inverse à l'aide de gradients réalisés avec des solutions d'eau, d'acétonitrile, contenant 0,01 % d'acide trifluoroacétique. Dans la majorité des cas, on observe dans les chromatogrammes quatre pics, correspondant aux quatre formes de diastéréoisomères
10 générés par le protocole de synthèse de ces composés phosphiniques. Tous les peptides phosphiniques ainsi purifiés ont été contrôlés par spectroscopie de masse.

Exemple 28

15 Dans cet exemple, on examine les constantes d'affinité K_i des pseudo-peptides des tableaux 5 à 8 vis-à-vis des différentes métalloprotéases matricielles MMP.

Les MMP utilisées ont été produites sous-
20 forme recombinante, dans un système d'expression E. coli, puis purifiées par différent types de chromatographies. A part la stromélysine-3 (MMP-11), les MMP produites correspondent aux séquences humaines. La Stromélysine-3 utilisée dans cette étude correspond
25 à la forme murine.

L'activité de chaque MMP a été déterminée en utilisant deux substrats synthétiques fluorogéniques. La coupure de ces substrats, qui engendre un signal de fluorescence proportionnel à la
30 quantité de substrat clivé, permet une détermination précise des paramètres cinétiques. Les valeurs des constantes K_m des substrats, prises en compte pour déterminer la valeur des K_i , sont reportées dans le

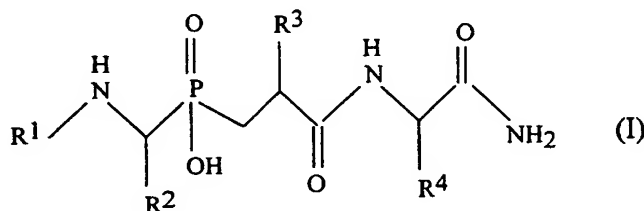
tableau qui suit. Les constantes d'affinité K_i ont été calculées à partir de l'équation de Horowitz et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, p. 6654-6658 [14], prenant en compte la dépendance du pourcentage d'inhibition mesuré expérimentalement selon la concentration de l'inhibiteur, en fonction de la concentration d'enzyme et de substrat.

Les expériences ont été réalisées dans un tampon Tris/HCl 50mM, pH 6,8, 10 mM CaCl_2 , 25°C.

type de MPP	$K_m \mu\text{M}$
MMP-11	0.2
MMP-2	58
MMP-9	13
MPP-14	26
MMP-1	93
MMP-7	86
MMP-8	60

Les résultats obtenus sont donnés dans les tableaux 5 à 8.

La formule générique des inhibiteurs synthétisés ici indique qu'il s'agit de pseudo-tripeptides phosphiniques. D'après le mode de liaison supposé de ces composés avec le site actif des MMP, ces inhibiteurs doivent interagir respectivement avec les sous-sites S_1 , S_1' et S_2' de ces enzymes. Le groupement R1 figurant dans la plupart des inhibiteurs est supposé interagir à la jonction des sous-sites S_3/S_2 .



Dans le tableau 5, on a vérifié l'influence de la nature du résidu R^3 sur l'efficacité du pseudo-peptide comme inhibiteur des MMP.

5 L'interaction des inhibiteurs avec le sous-site $S1'$, impliquant le groupe R^3 des composés, a fait l'objet d'une étude poussée, puisque ce sous-site est supposé contrôler en grande partie la sélectivité des interactions enzyme-inhibiteur.

10 L'analyse du tableau 5 démontre que la taille et la nature du résidu R^3 joue un rôle critique pour l'affinité des composés: ainsi l'activité des inhibiteurs apparaît multipliée par un facteur 30 dans le cas de la MMP-8, lorsque le groupe R^3 passe d'un résidu benzyle à phénylpropyle (composés 7 et 9). On
15 remarque que la gain d'affinité correspondant à cette substitution n'est pas constant pour les différentes MMP, suggérant que le sous-site $S1'$ de chaque MMP peut être sensible à la nature du résidu R^3 . A cet égard, il est intéressant de constater que la MMP-11 est la seule
20 MMP à préférer un résidu phénétyle, par rapport à un résidu phénylpropyle (composé 8 et 9).

La comparaison des composés 9, 10 et 11 qui ne diffèrent que par un seul atome (C, O, S) au niveau du résidu R^3 , suggère l'existence d'une interaction
25 spécifique entre l'atome de soufre en position γ de R^3 des inhibiteurs et le sous-site $S1'$ des MMP. Quelle que soit la MMP, le composé 11 est toujours le plus puissant parmi ces trois inhibiteurs.

30 Dans le tableau 6, les inhibiteurs se caractérisent par la présence d'un résidu phényle en R^2 , au lieu d'un résidu méthyle (tableau 5). La

comparaison des tableaux 5 et 6 révèle que la présence d'un résidu benzyle permet d'augmenter globalement l'affinité des inhibiteurs. Dans le cas spécifique de la MMP-11, la substitution méthyle->benzyle conduit à
5 une augmentation d'affinité beaucoup plus importante pour cette MMP, que pour les autres. Ce résultat indique la préférence du sous site S1 de la MMP-11 pour un résidu benzyle, par rapport à un résidu méthyle.

L'introduction d'une plus grande diversité
10 en R^3 dans cette série a permis de mieux cerner l'influence du résidu en R^3 . Cette série démontre que pour obtenir des inhibiteurs phosphiniques puissants vis à vis de certaines MMP, il faut introduire dans la position R^3 , une chaîne arylalkyle longue. Ainsi, le
15 composé 18 est un exemple d'inhibiteur très puissant de la MMP-8, MMP-11, MMP-2 et MMP-9.

Par rapport à ces MMP, on remarque que les inhibiteurs reportés dans cette étude apparaissent moins puissants vis à vis de la MMP-14.

20 De plus, de façon générale, ces pseudo-peptides apparaissent très peu actifs vis-à-vis des MMP-1 et MMP-7.

On remarquera que le composé 14 possédant un résidu R^3 phénétyle apparaît très puissant sur la
25 MMP-11, mais qu'il est beaucoup moins actif sur les autres MMP.

Le tableau 7 illustre l'importance du résidu tryptophane au niveau de la position R^4 , ainsi que l'importance de la configuration du résidu
30 tryptophane. Le composé 24 indique que le résidu tryptophane dans ces inhibiteurs peut être remplacé par

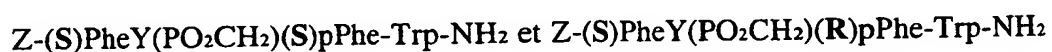
un autre résidu aromatique Dpa (dinitrobenzyle) dans le cas de la MMP-11 et de la MMP-8

Le tableau 8 illustre l'effet de différentes modifications au niveau du groupe R^1 (Table IV). L'analyse des résultats indique que la nature de R^1 influence l'affinité des composés vis à vis des différentes MMP. Le composé 31 est un exemple d'inhibiteur très puissant vis-à-vis de la MMP-11, présentant une certaine sélectivité pour cette enzyme. Les composés 34 et 35 représentent des exemples d'inhibiteurs puissants dans lesquels R^1 correspond à un acide aminé naturel.

Exemple 29

Dans cet exemple, on étudie l'influence de la configuration des deux positions R^2 et R^3 sur l'efficacité des pseudo-peptides comme inhibiteur des MMP.

La voie de synthèse utilisée dans les exemples précédents pour préparer les dérivés phosphiniques de ce brevet aboutit à l'obtention de chaque inhibiteur sous forme d'un mélange de quatre diastéréoisomères, provenant de la présence de deux centres asymétriques au niveau des carbone alpha portant les résidus R^2 et R^3 . Afin d'évaluer l'influence de la configuration de ces deux positions, le composé 15 a été resynthétisé en partant de l'acide aminé phénylalanine phosphinique optiquement pur, de configuration R ou S. Chaque synthèse aboutit à un mélange de deux diastéréoisomères:



ou

Z-(R)PheY(PO₂CH₂)(S)pPhe-Trp-NH₂ et Z-(R)PheY(PO₂CH₂)(R)pPhe-Trp-NH₂
facilement séparables par HPLC en phase inverse. Le
tableau 9 présente l'activité des quatre
5 diastéréoisomères du composé 15 vis-à-vis des
différentes MMP. Il est intéressant de remarquer que
pour cette classe de composés phosphiniques, au moins
trois diastéréoisomères inhibent de façon presque
équivalente les différentes MMP. Cette propriété, en
10 dehors d'un moyen de contrôler la sélectivité des
inhibiteurs, pourrait s'avérer être aussi très
importante en terme de métabolisme et de
pharmacocinétique, deux paramètres pouvant être
sensibles à la stéréochimie des molécules.

15 Les résultats de la caractérisation par RMN
du proton, du carbone 13 et du phosphore de la fraction
RI du composé 15 sont donnés en annexe.

Exemple 30

20 Dans cet exemple, on mesure l'efficacité
anti-tumorale du composé 15 (fraction RI) du tableau 9
(RXPO3).

Le modèle de tumorigénèse utilisé pour
tester les effets de cet inhibiteur RXPO3 *in vivo*
25 consiste en une greffe sous-cutanée de cellules
malignes murines C26 chez des souris syngéniques
(possédant un fond génétique compatible avec celui des
cellules injectées).

Les cellules C26 établies à partir d'un
30 cancer colique de souris Balb c (Corbett et al., 1975,
Cancer Res, 35:2434-2439 [15] sont cultivées jusqu'à
subconfluence. Après trypsinisation, les cellules sont
centrifugées à 1000g pendant 10 minutes. Le culot est

lavé et remis en suspension dans du PBS 1X. Un volume de 200 ml, contenant 5×10^4 cellules C26, est injecté en sous-cutané en 2 endroits du dos de souris âgées de 8 à 9 semaines. L'inhibiteur est solubilisé dans du PBS 1X et l'administration de 150 mg d'inhibiteur dans un volume de 150ml se fait par voie intrapéritonéale. Le traitement commence le jour de l'injection des cellules C26 et se poursuit à raison d'une injection par jour pendant 25 jours. Les volumes tumoraux sont mesurés tous les jours.

Trois expériences identiques et indépendantes de tumorigénèse ont été réalisées, selon le protocole précité. Les résultats obtenus étaient similaires. L'une d'entre-elles est rapportée ci-dessous.

L'expérience a concerné 12 animaux, 6 d'entre eux recevant un traitement (150 μ g d'inhibiteur/souris/jour) et 6 servant d'animaux témoins (150 μ l PBS 1X). La figure 2 montre les valeurs médianes des volumes tumoraux en fonction du temps écoulé depuis l'injection des cellules C26 (Jours 10 à 25).

On observe que les tumeurs commencent à apparaître au jour J10, et que leurs volumes moyens et médians sont toujours inférieurs chez les animaux traités par l'inhibiteur RXPO3. Cette différence de taille des tumeurs est de l'ordre de 50% du jour J15 au jour J20. Par la suite, l'efficacité de l'inhibiteur apparaît moindre. Ces résultats sont en accord avec les récentes observations faites sur un autre modèle de tumorigénèse mettant en oeuvre des animaux sauvages ou déficients pour l'expression de la stromélysine-3 (MMP-11) et montrant que cette métalloprotéase matricielle

est impliquée dans les étapes initiales d'implantation et favorise le développement des tumeurs. D'après ce modèle, l'efficacité des inhibiteurs doit être maximale durant les premiers jours du développement de la

5 tumeur.

REFERENCES CITEES

- [1] : Brown, Medical Oncology, 1997, 14, p. 1-10.
- 5 [2] : Beckett et al, 1998, Exp. Opin. Ther. Patents, 8, p. 259-289.
- [3] : Goulet et al, Bioorg. Med. Chem. Lett. 4, 1994, p. 1221-1224.
- 10 [4] : Caldwell et al, Bioorg. Med. Chem. Letter 6, 1996, p.323-328.
- [5] : FR-A- 2 676 059.
- 15 [6] : FR-A-2 689 764.
- [7] : EP-A-0 725 075
- 20 [8] : Yotakis et al, J. Org. Chem., 1996, 61, p. 6601-6605.
- [9] : Jiracek et al, J. Biol. Chem., 1995, 270, p. 21701-21706.
- 25 [10] : J. Biol. Chem., 1996, 271, p. 19606-19611.
- [11] : Eistetter et al, J. Med. Chem., 25, p 109-113, 1982.
- 30 [12] : Baldwin et al, J. Chem. Soc. Chem. Comm. 1986, p 1339-1340.
- [13] : Baylis et al, J. Chem. Soc. Perkin Trans I, 1984, p. 2845-2853.
- 35 [14] : Horowitz et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, p. 6654-6658.
- 40 [15] : Corbett et al., 1975, Cancer Res, 35:2434-2439.

Tableau 1

Acrylate de formule :

 R^3

|

 $CH_2 = C - COOC_2H_5$

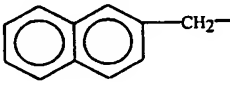
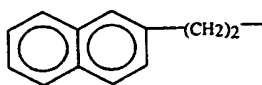
Ex.	composé	R^3	Pf (mm Hg) °C	Rende- ment (%)
1	2a	$C_6H_5 CH_2-$	64-65 (0,01)	80
2	2b	$C_6H_5 -(CH_2)_2-$	90-95 (0,7)	76
3	2c	$C_6H_5 (CH_2)_3-$	112-115 (0,6)	87
4	2d	$C_6H_5 (CH_2)_4-$	120-125 (0,005)	78
5	2e		huile	25
6	2f	$CH_3(CH_2)_6-$	101-105 (8)	40
7	2g		Huile	13

Tableau 2

Acrylate de formule :

 R^3

|

 $CH_2 = C - COOC_2H_5$

Ex.	composé	$R^3 = R \text{ X } CH_2$ avec $X = O$ ou S .	Rendement
8	2h	$MeO - \text{C}_6\text{H}_4 - CH_2 - S - CH_2 -$	80 %
9	2i	$\text{C}_6\text{H}_5 - CH_2 - S - CH_2 -$	88 %
10	2j	$\text{C}_6\text{H}_5 - CH_2 - O - CH_2 -$	85 %

Tableau 3

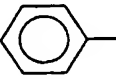
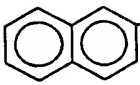
Ex.	Bloc phosphinique	R ²	R ³	Rendement %	Rf
11	3a	H	C ₆ H ₅ CH ₂ (2a)	80	0,41
12	3b	H	C ₆ H ₅ -(CH ₂) ₂ (2b)	95	0,47
13	3c	H	C ₆ H ₅ (CH ₂) ₃ (2c)	83	0,57
14	3d	H	C ₆ H ₅ —CH ₂ —O—CH ₂ (2j)	61	0,69
15	3e	H	C ₆ H ₅ —CH ₂ —S—CH ₂ (2i)	60	0,48
16	3f	Phényle	C ₆ H ₅ (CH ₂) ₂ (2b)	85	0,77
17	3g	"	C ₆ H ₅ (CH ₂) ₃ (2c)	79	0,80
18	3h	"	C ₆ H ₅ (CH ₂) ₄ (2d)	75	0,82
19	3i	"	CH ₃ (CH ₂) ₆ (2f)	81	0,68
20	3j	"	C ₆ H ₅ —CH ₂ —O—CH ₂ (2j)	64	0,61
21	3k	"	MeO—  —CH ₂ — S— (2h)	40	0,63
22	3l	"	 —CH ₂ (2e)	60	0,66

Tableau 3 (suite)


Ex.	Bloc phosphinique	R ²	R ³	Rendement %	Rf
23	3m	..	 (2g)	30	0,65

Tableau 4

Composé de départ	Composé 4	Rendement	Rf ⁽¹⁾	Composé 5	Rendement	Rf ⁽²⁾
3a	4a	95	0,70	5a	80	0,53 ⁽¹⁾
3b	4b	97	0,72	5b	81	0,59 ⁽¹⁾
3c	4c	97	0,73	5c	85	0,21
3d	4d	93	0,77	5d	90	0,42 ⁽¹⁾
3e	4e	72	0,72	5e	92	0,50 ⁽¹⁾
3f	4f	89	0,61	5f	95	0,42
3g	4g	75	0,66	5g	97	0,42
3h	4h	95	0,63	5h	95	0,44
3i	4i	96	0,78	5i	78	0,56
3j	4j	91	0,71	5j	80	0,26
3k	4k	93	0,66	5k	94	0,46
3l	4l	91	0,53	5l	92	0,38
3m	4m	95	0,57	5m	86	0,35

⁽¹⁾ dans le mélange hexane/acétate d'éthyle/acide acétique (3:3:0,2)

5 ⁽²⁾ dans le mélange chloroforme/méthanol (9,5: 0,5).

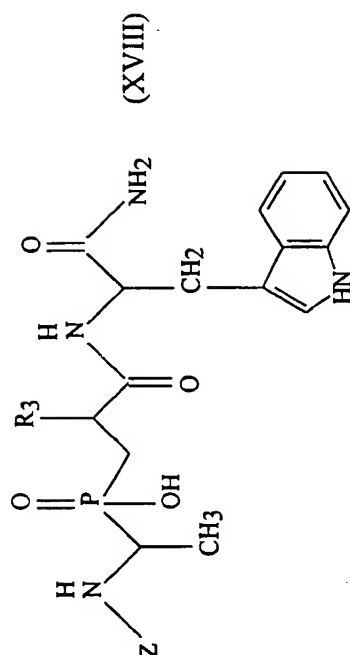
Tableau 5: Influence du groupe R³ : Valeur des constantes d'affinité Ki.

Tableau 5

Composé N°	[R 3] =	MMP-11 mST3	MMP-2 Gel-A	MMP-9 Gel-B	MMP-14 MT1-MMP	MMP-1 HFC	MMP-7 Matrilysin	MMP-8 HNC
7	CH ₂ -φ (Phe)	350 nM	250 nM	280 nM	2030 nM	24 % @ 2mM	71 % @ 0mM	240 nM
8	CH ₂ -CH ₂ -f	51 nM	80 nM	60 nM	270 nM	23 % @ 2mM	43 % @ 50mM	20 nM
9	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -f	100 nM	31 nM	23 nM	92 nM	30 % @ 2mM	51 % @ 50mM	8 nM
10	CH ₂ -O-CH ₂ -f	175 nM	250 nM	44 nM	550 nM	15 % @ 2mM	27 % @ 50mM	19 nM
11	CH ₂ -S-CH ₂ -f	36 nM	14 nM	6 nM	26 nM	45 % @ 2mM	36 % @ 50mM	< 0,5 nM

Tableau 6: Influence du groupe R³ : Valeur des constantes d'affinité Ki.

	[R 3] =	MMP-11	MMP-2	MMP-9	MMP-14	MMP-1	MMP-7	MMP-8
12	CH ₃ (Ala)	2670 nM	0% @ 2mM	0% @ 2mM	0% @ 10mM	20% @ 2mM	10% @ 50mM	9% @ 1mM
13	CH ₂ -CH-(CH ₃) ₂ (Leu)	22 nM	202 nM	65 nM	192 nM	45% @ 2mM	210 nM	40 nM
14	CH ₂ -CH ₂ -φ	8.8 nM	275 nM	110 nM	660 nM	10% @ 2mM	62% @ 50mM	45 nM
15	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -φ	5 nM	20 nM	10 nM	105 nM	23% @ 2mM	65% @ 50mM	2.5 nM
16	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -φ	33 nM	145 nM	70 nM	580 nM	5% @ 2mM	65% @ 50mM	4.3 nM
17	CH ₂ -O-CH ₂ -φ	16 nM	85 nM	55 nM	545 nM	9% @ 2mM	40% @ 50mM	20 nM
18	CH ₂ -S-CH ₂ -f-OMe	2 nM	6 nM	3 nM	22 nM	13% @ 2mM	84% @ 50mM	0.7 nM
19	CH ₂ -Naphthyl	74 nM	330 nM	675 nM	1350 nM	0% @ 5mM	1800 nM	230 nM
20	CH ₂ -CH ₂ -Naphthyl	12 nM	30 nM	55 nM	125 nM	0% @ 2mM	2100 nM	34 nM
21	(CH ₂) ₇	34 nM	75 nM	30 nM	271 nM	27% @ 2mM	50% @ 50mM	6 nM

Tableau 7 : Influence du résidu en position Yaa1 : Valeur des constantes d'affinité K_i .

Composé N°	Yaa'	MMP-11 mST3	MMP-2 Gel-A	MMP-9 Gel-B	MMP-14 MT1-MMP	MMP-1 HFC	MMP-7 Matrilysin	MMP-8 HNC
22	Ala	20% @ 1mM	31% @ 2mM	45% @ 2mM	2960 nM	9% @ 2mM	23% @ 50mM	240nM
15	L-Trp	5 nM	20 nM	10 nM	105 nM	23% @ 2mM	65% @ 50mM	2,5 nM
23	D-Trp	1% @ 1mM	6% @ 2mM	14% @ 2mM	10% @ 10mM	3% @ 10mM	18% @ 50mM	2% @ 1mM
24	Dpa	27 nM	260 nM	245 nM	1282 nM	9% @ 2mM	61% @ 50mM	25 nM

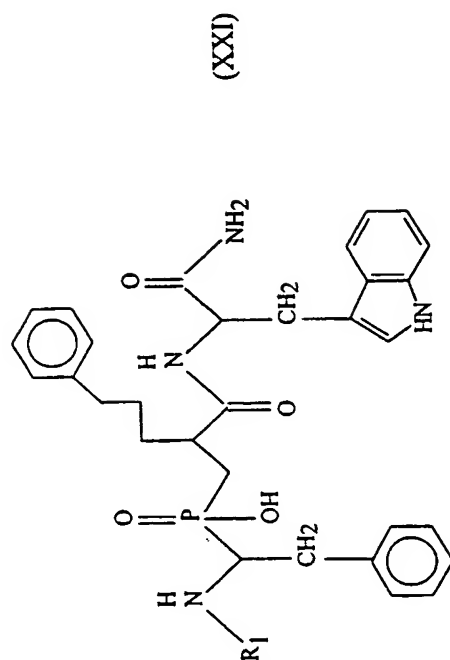
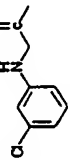
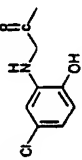
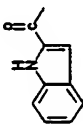
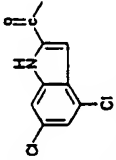
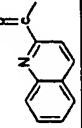
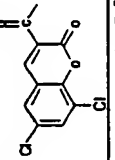
Tableau 8: Influence du résidu R1: Valeur des constantes d'affinité K_i .

Tableau 8

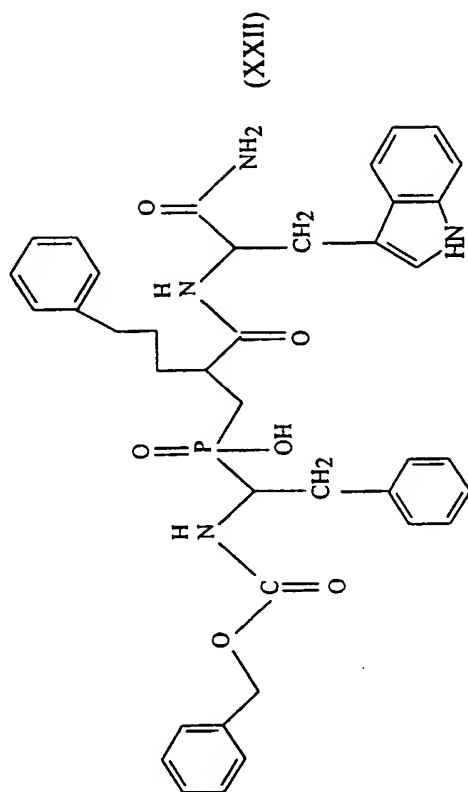
Composé N°	[R1] =	MMP-11 mST3	MMP-2 Gel-A	MMP-9 Gel-B	MMP-14 MT1-MMP	MMP-1 HFC	MMP-7 Matrilysin	MMP-8 HNC
25		20 nM	26 nM	35 nM	90 nM	29% @ 1μM	16% @ 1μM	3,5 nM
26		5 nM	8 nM	10 nM	40 nM	28% @ 1μM	33% @ 1μM	2,5 nM
27		15 nM	17 nM	6 nM	73 nM	33% @ 1μM	16% @ 1μM	4,5 nM

Tableau 8 (suite)

Composé N°	[R1] =	MMP-11 mST3	MMP-2 Gel-A	MMP-9 Gel-B	MMP-14 MT1-MMP	MMP-1 HFC	MMP-7 Matrilysin	MMP-8 HNC
28		3.8 nM	9 nM	6 nM	45 nM	63% @ 1µM	25% @ 1µM	4 nM
29		10 nM	30 nM	34 nM	63 nM	55% @ 1µM	48% @ 1µM	7.5 nM
30		1.5 nM	10 nM	8 nM	41 nM	87% @ 1µM	605 nM	1? nM
31		0.9 nM	24 nM	7 nM	32 nM	36 nM	117 nM	5 nM
32		4.2 nM	19 nM	13 nM	60 nM	78% @ 1µM	370 nM	5 nM
33		5 nM	100 nM	110 nM	217 nM	47% @ 1µM	37% @ 1µM	17 nM
34	Z-Ala	8 nM	11 nM	10 nM	41 nM	24% @ 1µM	18% @ 1µM	5.5 nM
35	Z-Leu	6 nM	40 nM	22 nM	53 nM	20% @ 1µM	32% @ 1µM	7 nM

B 13201.3 MDT

Tableau 9 : influence de la configuration des résidus R² et R³ : Valeur des constantes d'affinité Ki.



configuration du résidu R2	Fraction HPLC	MMP-11 mST3	MMP-2 Gel-A	MMP-9 Gel-B	MMP-14 MT1-MMP	MMP-1 HFC	MMP-7 Matrilysin	MMP-8 HNC
S	I	5 nM	45 nM	33 nM	135 nM	17 % @ 2mM	59 % @ 20mM	16 nM
S	II	50 nM	365 nM	250 nM	2290 nM	6 % @ 2mM	29 % @ 20mM	460 nM
R	I	6 nM	54 nM	42 nM	90 nM	18 % @ 2mM	44 % @ 20mM	16 nM
R	II	9 nM	42 nM	78 nM	385 nM	16 % @ 2mM	34 % @ 20mM	65 nM

Bloc 3b : ZAlaΨ(PO₂CpH₂)hPheOEt.

¹ H	Z	Phe	hPhe	OEt
NH		5,36		
Hα		4,05	2,85	
Hβ		1,28	1,95/1,84	
Hγ			2,55	
CH ₃				1,28
Arom	6,62-7,33		6,62-7,33	
CH ₂ /CpH ₂	5,12		1,84/2,25	4,1

¹³ C	Z	Phe	hPhe	OEt
Cα		45,35/46,05*	39,2	
Cβ		14,6	35,9	
Cγ			33,4	
CH ₃				61,4
Arom	126,4-141,4	126,4-141,4		
C = O	156,2		174,9	
CH ₂ /Cp	67,6		28,5/27,8*	14,6

*2 diastéréoisomères

³¹ P	54,45/54,23
-----------------	-------------

δ(ppm) Ref. ¹H CHCl₃ (7,26 ppm). Temp.: 298K Solvant : CDCl₃

Ref. ¹³C CDCl₃ (77,36 ppm).

Ref. ³¹P H₃PO₄ (0 ppm).

Bloc 3d : ZAlaΨ(PO₂CpH₂)Ser(Bn)OEt.

¹ H	Z	Ala	Ser (Bn)	OEt
NH		5,41		
Hα		4,05	3,09	
Hβ		1,35	3,65	
Hδ			4,48	
CH ₃				1,2
Arom	7,26-7,32		7,26-7,32	
CH ₂ /CpH ₂	5,09		2,02/2,25	4,12

¹³ C	Z	Ala	Ser (Bn)	OEt
Cα		45,20/46,8*	40,13	
Cβ		14,42	71,38	
Cδ			73,5	
CH ₃				61,77
Arom	127,9-138,2	127,9-138,2		
C = O	156,3		173,2	
CH ₂ /Cp	67,64		24,16/25,77*	14,42

*2 diastéréoisomères

³¹ P	54,3
-----------------	------

δ(ppm) Ref. ¹H CHCl₃ (7,26 ppm). Temp.: 298K Solvant : CDCl₃

Ref. ¹³C CDCl₃ (77,36 ppm).

Ref. ³¹P H₃PO₄ (0 ppm).

Bloc 3e : ZAlaΨ(PO₂CpH₂)Cys(Bn)OEt.

¹ H	Z	Ala	Cys (Bn)	OEt
NH		5,41		
Hα		4,08	3	
Hβ		1,35	2,50/2,75	
Hδ			3,65	
CH ₃				1,22
Arom	7,26-7,33		7,26-7,33	
CH ₂ /CpH ₂	5,12		2,02/2,25	4,15

¹³ C	Z	Ala	Cys (Bn)	OEt
Cα		44,93/46,7*	39,19	
Cβ		14,4	34,56	
Cδ			36,33	
CH ₃				61,7
Arom	127,4-138,1	127,4-138,1		
C = O	156,17		173,56	
CH ₂ /Cp	67,78		26,88/28,19*	14,43

*2 diastéréoisomères

³¹ P	54,41/54,23
-----------------	-------------

δ(ppm) Ref. ¹H CHCl₃ (7,26 ppm). Temp.: 298K Solvant : CDCl₃Ref. ¹³C CDCl₃ (77,36 ppm).Ref. ³¹P H₃PO₄ (0 ppm).

Bloc 3f : ZPheΨ(PO₂CpH₂)hPheOEt.

¹ H	Z	Phe	hPhe	OEt
NH		5, 61		
Hα		4, 2	2, 92	
Hβ		3, 17/2, 83	1, 97/1, 83	
Hγ			2, 55	
CH ₃				1, 23
Arom	7, 0-7, 3	7, 0-7, 3		
CH ₂ /CpH ₂	5		1, 85/2, 22	4, 15

¹³ C	Z	Phe	hPhe	OEt
Cα		52, 1/53, 5*	39, 8	
Cβ		34	35, 5	
Cγ			33, 1	
CH ₃				63, 05
Arom	127-141	127-141		
C = O	158			177, 6
CH ₂ /CpH ₂	68, 5		28, 9/27, 7*	14, 1

*2 diastéréoisomères

³¹ P	51, 34
-----------------	--------

δ(ppm) Ref. ¹H CHCl₃ (7,26 ppm). Temp.: 298K Solvant : CDCl₃

Ref. ¹³C CDCl₃ (77,36 ppm).

Ref. ³¹P H₃PO₄ (0 ppm).

Bloc 3g : ZPheΨ(PO₂CpH₂)pPheOEt.

¹ H	Z	Phe	pPhe	OEt
NH		4,98		
Hα		4,2	2,87	
Hβ		3,23/2,83	1,53/1,45	
Hγ			1,51	
Hδ			2,52	
CH ₃				1,21
Arom	7,14-7,26	7,14-7,26		
CH ₂ /CpH ₂	4,94		1,75-2,21	4,13

¹³ C	Z	Phe	pPhe	OEt
Cα		51,75/53,3*	39,7	
Cβ		33,85	33,6	
Cγ			28,4	
Cδ			35,7	
CH ₃				62,3
Arom	126,6-142,3	126,6-142,3		
C = O	157,7		177,2	
CH ₂ /Cp	68,3		29,1/28*	13,9

*2 diastéréoisomères

³¹ P	52,2/53,1
-----------------	-----------

δ(ppm) Ref. ¹H CHCl₃ (7,26 ppm). Temp.: 298K Solvant : CDCl₃

Ref. ¹³C CDCl₃ (77,36 ppm).

Ref. ³¹P H₃PO₄ (0 ppm).

Bloc 3h : ZPheΨ(PO₂CpH₂)bPheOEt.

¹ H	Z	Phe	bPhe	OEt
NH		5,4		
Hα		4,25	2,8	
Hβ		3,26/2,82	1,62/1,53	
Hγ			1,25	
Hε			1,52	
Hδ			2,52	
CH ₃				1,2
Arom	7,0-7,26	7,0-7,26		
CH ₂ /CpH ₂	4,99		1,75-2,23	4,1

¹³ C	Z	Phe	bPhe	OEt
Cα		52,2/50,9*	39,7	
Cβ		34,4	34	
Cγ			26,4	
Cδ			31,2	
Cε			35,8	
CH ₃				61,4
Arom	126,4-142,6	126,4-142,6		
C = O	156,5		175,3	
CH ₂ /Cp	67,45		28,44/29,3*	14,2

*2 diastéréoisomères

³¹ P	52,2/53,1
-----------------	-----------

δ(ppm) Ref. ¹H CHCl₃ (7,26 ppm). Temp.: 298K Solvant : CDCl₃

Ref. ¹³C CDCl₃ (77,36 ppm).

Ref. ³¹P H₃PO₄ (0 ppm).

Bloc 3i : ZPheΨ(PO₂CpH₂)HeptOEt.

¹ H	Z	Phe	Hept	OEt
NH		5,46		
Hα		4,26	2,8	
Hβ		3,28/2,85	1,50/1,63	
Hγ-Hζ			1,2	
CH ₃			0,83	1,23
Arom	7,16/7,27	7,67-7,27		
CH ₂ /CpH ₂	4,98		1,75/2,23	4,2

¹³ C	Z	Phe	Hept	OEt
Cα		51,25/52,8*	39,31	
Cβ		34,2	34,6	
Cγ/Cζ			31,97 , 29,31 26,65 , 22,81	
CH ₃			14,5	61,2
Arom	127,5-137,6	127,5-137,6		
C = O	156,36		175,37	
CH ₂ /Cp	67,23		29,73/28,45*	14,6

*2 diastéréoisomères

³¹ P	54,41/53,96
-----------------	-------------

δ (ppm) Ref. ¹H CHCl₃ (7,26 ppm). Temp.: 298K Solvant : CDCl₃

Ref. ¹³C CDCl₃ (77,36 ppm).

Ref. ³¹P H₃PO₄ (0 ppm).

Bloc 3j : ZPheΨ(PO₂CpH₂)Ser(Bn)OEt.

¹ H	Z	Phe	Ser (Bn)	OEt
NH		5,48		
Hα		4,3	3,12	
Hβ		3,28/2,85	3,65	
Hδ			4,45	
CH ₃				1,22
Arom	7,16-7,36	7,16/7,36		
CH ₂ /CpH ₂	4,97		2,0/2,27	4,15

¹³ C	Z	Phe	Ser (Bn)	OEt
Cα		52,65/50,9*	39,93	
Cβ		34,16	71,42	
Cδ			73,44	
CH ₃				61,6
Arom	126-138,1	126-138,1		
C = O	156,4		173,2	
CH ₂ /Cp	67,47		24,9/25,36*	13,94

*2 diastéréoisomères

³¹ P	53,7/53,59
-----------------	------------

δ(ppm) Ref. ¹H CHCl₃ (7,26 ppm). Temp.: 298K Solvant : CDCl₃

Ref. ¹³C CDCl₃ (77,36 ppm).

Ref. ³¹P H₃PO₄ (0 ppm).

Bloc 3k : ZPheΨ(PO₂CpH₂)Cys(pOMeBn)OEt.

¹ H	Z	Phe	Cys (pOMeBn)	OEt
NH		5,41		
Hα		4,3	3,03	
Hβ		3,27/2,80	2,53/2,70	
Hγ			3,6	
CH ₃			3,75	1,2
Arom	7,18-7,36	7,18-7,36		
CH ₂ /CpH ₂	4,98		2,03/2,15	4,15

¹³ C	Z	Phe	Cys (pOMeBn)	OEt
Cα		52,1/50,8*	39,6	
Cβ		34,42	35	
Cδ			35,6	
CH ₃			55,98	61,74
Arom	127,2-130,4	127,2-130,4		
C = O	159		173,6	
CH ₂ /Cp	67,32		27,9/29,1*	14,46

*2 diastéréoisomères

³¹ P	53,76/54,07
-----------------	-------------

δ(ppm) Ref. ¹H CHCl₃ (7,26 ppm). Temp.: 298K Solvant : CDCl₃

Ref. ¹³C CDCl₃ (77,36 ppm).

Ref. ³¹P H₃PO₄ (0 ppm).

Composé 15 : ZPheΨ(PO₂CpH₂)pPheTrpNH₂

Fraction RI du tableau 9

¹ H	Z	Phe	pPhe	Trp
NH		5,63		7,05
Hα		4,17	2,87	4,72
Hβ		3,13/2,75	1,59/1,40	3,25
Hγ			1,45	
Hδ			2,46	
CH ₂ /CpH ₂	4,95		1,81/2,06	

¹³ C	Z	Phe	pPhe	Trp
Cα		52		54,7
Cβ		33,85	34,06	27,7
Cγ			28,53	
Cδ			35,63	
C = O	158,17		177,19	176,93
CH ₂ /Cp	68,81		28,45	

³¹ P	51,76/52,94
-----------------	-------------

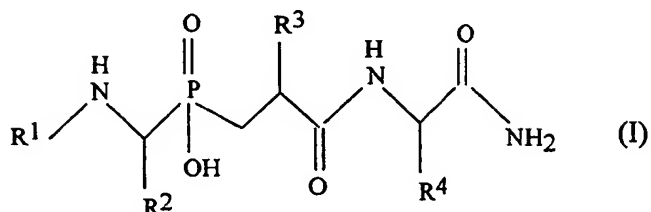
δ(ppm) Ref. ¹H CHCl₃ (7,26 ppm). Temp.: 298K Solvant : CDCl₃

Ref. ¹³C CDCl₃ (77,36 ppm).

Ref. ³¹P H₃PO₄ (0 ppm).

REVENDEICATIONS

1. Pseudo-peptide phosphinique de formule :



5

dans laquelle

- R¹ est un groupe bloquant une fonction amine, ou un résidu d'acide aminé ou de peptide à fonction amine terminale bloquée,

10 - R² représente la chaîne latérale d'un acide aminé naturel ou non naturel,

- R^3 représente :

1) la chaîne latérale d'un acide aminé naturel sauf Gly et Ala, non substituée ou substituée par un groupe aryle,

2) un groupe aralkyle, ou

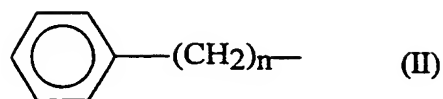
3) un groupe alkyle d'au moins 3 atomes de carbone, et

- R⁴ représente une chaîne latérale d'acide aminé
naturel ou non naturel, ou un groupe dinitrobenzyle.

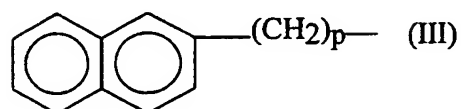
2. Pseudo-peptide selon la revendication 1, dans lequel R² représente le groupe méthyle ou benzyle.

3. Pseudo-peptide selon la revendication 1,
dans lequel R³ représente la chaîne latérale d'un acide
aminé choisi parmi Phe et Leu ou un résidu Ser ou Cys
dont la chaîne latérale est substituée par un groupe
arylakyle.

4. Pseudo-peptide selon la revendication 1,
dans lequel R³ est un groupe aralkyle choisi parmi les
30 groupes de formule :

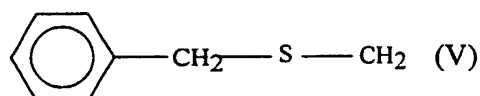
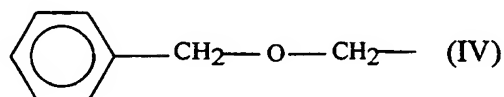


avec n étant un nombre entier de 1 à 4, et de formule :

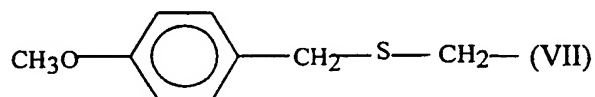
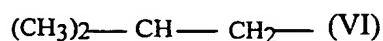


5 avec p égal à 1 ou 2.

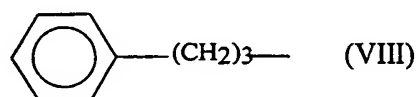
5. Pseudo-peptide selon la revendication 1 dans lequel R^3 est un groupe répondant à l'une des formules suivantes :



10

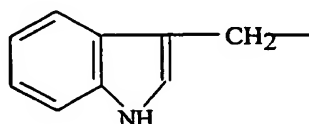


15 6. Pseudo-peptide selon la revendication 1, dans lequel R^3 est le groupe de formule :



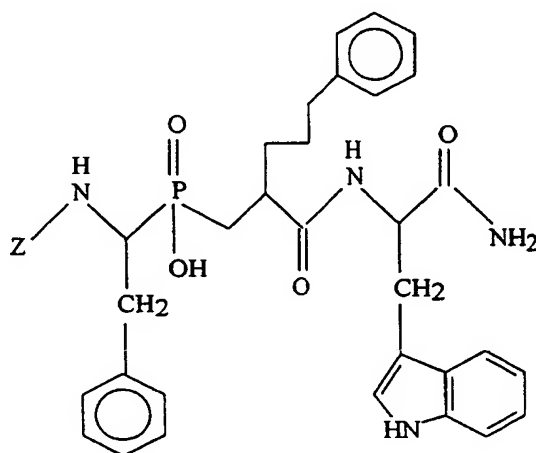
7. Pseudo-peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans lequel R^4 représente le groupe de formule :

20



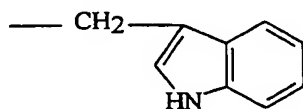
8. Pseudo-peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans lequel R¹ représente un groupe choisi parmi les groupes acétyle, benzyloxyacétyle, phénylaminoacétyle, m-chlorophényl)aminoacétyle, (2-hydroxy-5-chloro-phényl) amino acétyle, indolyl-2-carbonyle, 4,6-dichloro-indolyl-2-carbonyle, quinolyl-2-carbonyle et 1-oxa-2,4-dichloro-7-naphtalène carbonyle.

10 9. Pseudo-peptide selon la revendication 1 qui répond à la formule :



dans laquelle Z est le groupe benzyloxycarbonyle.

10. Pseudo-peptide selon la revendication 15 9, dans lequel le groupe



est sous forme L.

11. Composition pharmaceutique inhibant au moins une métalloprotéase à zinc matricielle, comprenant au moins un pseudo-peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 10.

12. Composition selon la revendication 11 dans laquelle la métalloprotéase à zinc matricielle est choisie parmi les MMP-2, MMP-8, MMP-9 et MMP-11.

5 13. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 11 et 12, pour le traitement d'une maladie caractérisée par la surexpression des protéases matricielles.

14. Composition selon la revendication 13, pour le traitement du cancer.

10 15. Utilisation d'un pseudo-peptide phosphinique selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 pour la fabrication d'un médicament inhibant au moins une métalloprotéase à zinc matricielle.

15 16. Utilisation selon la revendication 15, dans laquelle la métalloprotéase à zinc matricielle est choisie parmi les MMP-2, MMP-8, MMP-9 et MMP-11.

20 17. Utilisation selon la revendication 15 ou 16, dans laquelle le médicament est destiné au traitement d'une maladie caractérisée par la surexpression des protéases matricielles.

18. Utilisation selon la revendication 17, dans laquelle la maladie est le cancer.

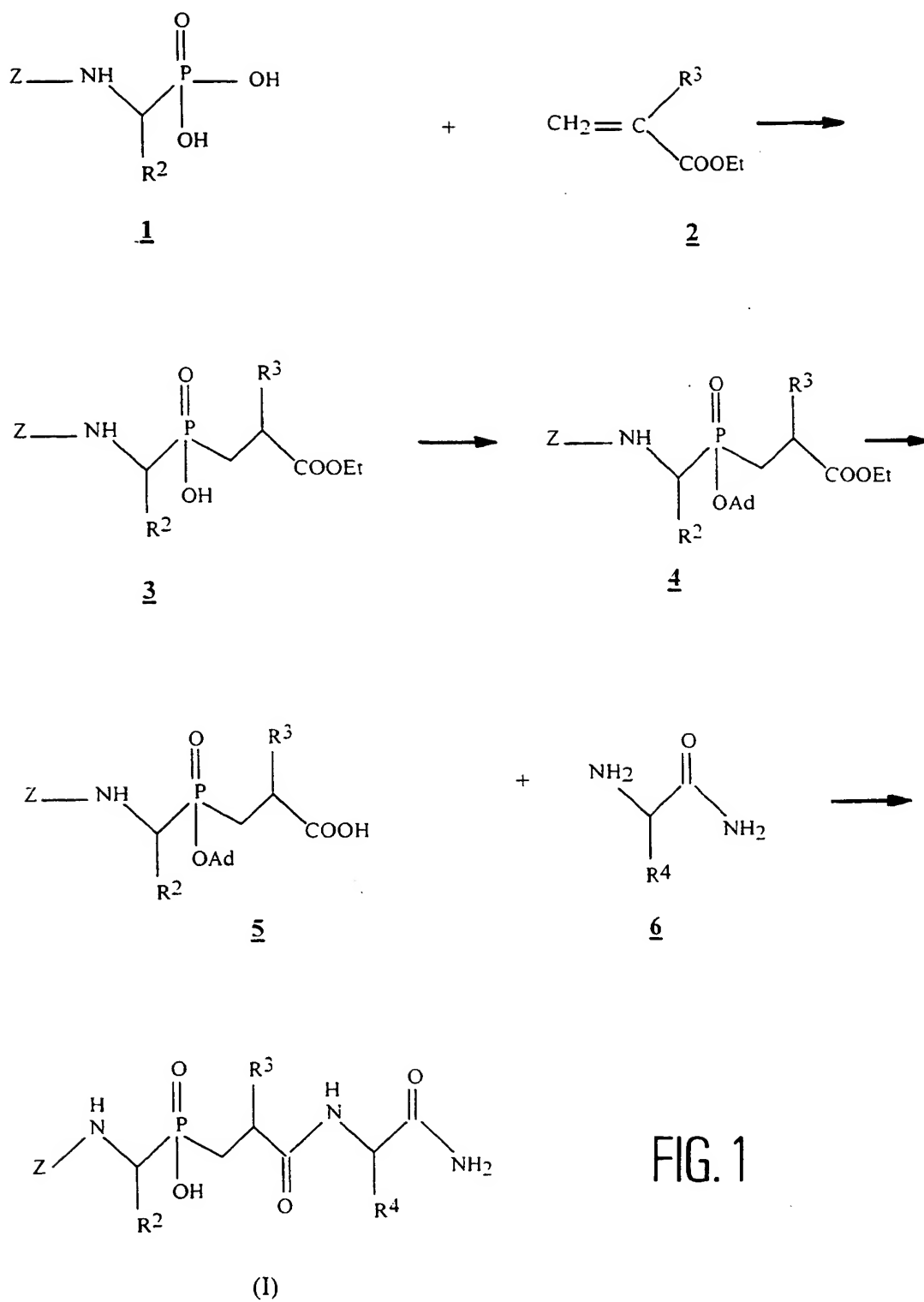


FIG. 1

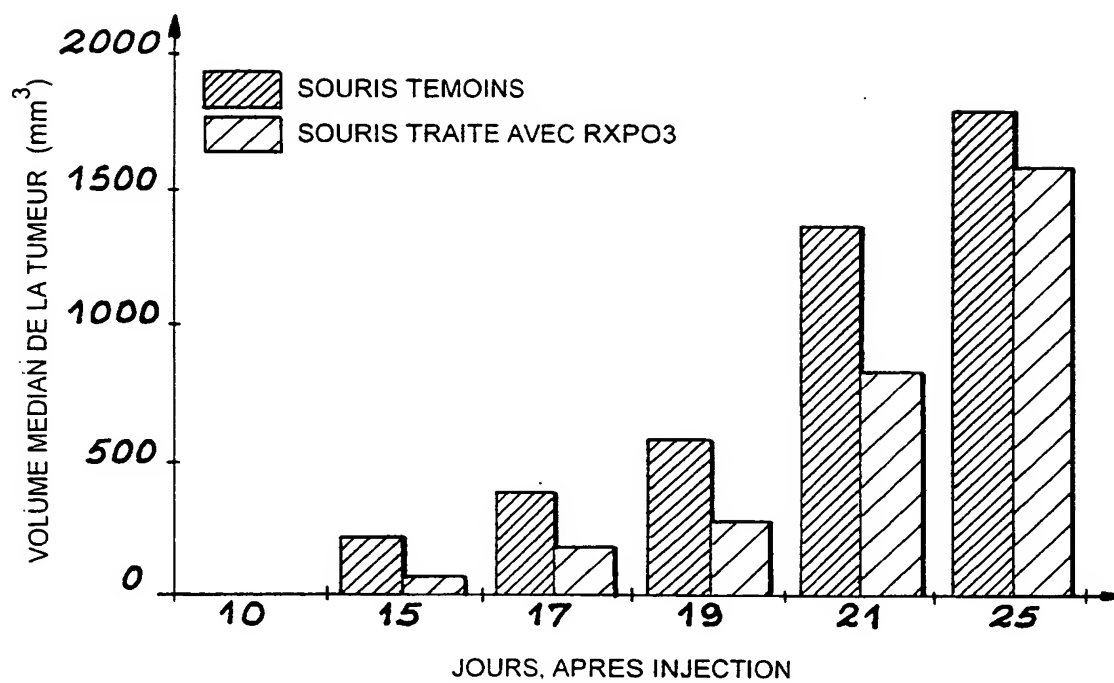


FIG. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/00093

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07F9/30 A61K31/66 C07F9/572 C07F9/6558 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07F A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 98 03516 A (PFIZER INC.) 29 January 1998 (1998-01-29) the whole document	1-18
Y	WO 93 14112 A (MERCK & CO., INC.) 22 July 1993 (1993-07-22) the whole document	1-18
A	FR 2 676 059 A (COMMISSARIAT À L'ÉNERGIE ATOMIQUE) 6 November 1992 (1992-11-06) cited in the application -/-	1-18

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 April 2000

Date of mailing of the international search report

03/05/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Beslier, L

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. n. Application No
PCT/FR 99/00093

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GOULET J L ET AL: "Inhibition of stromelysin-1 (MMP-3) by peptidyl phosphinic acids" BIOORG. MED. CHEM. LETT. (BMCLE8,0960894X);1994; VOL.4 (10); PP.1221-4, XP002117546 Merck Res.;Dep. Med. Chem. Res.; Rahway; 07064-0900; NJ; USA (US) cited in the application the whole document	1-18
P,X	VASSILIOU S. ET AL.: "Phosphinic pseudo-tripeptides as potent inhibitors of matrix metalloproteinases: a structure-activity study" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY., vol. 42, no. 14, - 15 July 1999 (1999-07-15) pages 2610-2620, XP002135494 AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. WASHINGTON., US ISSN: 0022-2623 the whole document	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/00093

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9803516 A	29-01-1998	AP 761 A	13-09-1999
		AU 712973 B	18-11-1999
		AU 3104297 A	10-02-1998
		BG 103111 A	30-11-1999
		CN 1225639 A	11-08-1999
		CZ 9900118 A	17-11-1999
		EP 0923585 A	23-06-1999
		HR 970391 A	31-08-1998
		JP 11514673 T	14-12-1999
		NO 990184 A	15-03-1999
		PL 331254 A	05-07-1999
WO 9314112 A	22-07-1993	AU 3475393 A	03-08-1993
		CA 2126687 A	22-07-1993
		EP 0623143 A	09-11-1994
		JP 7503016 T	30-03-1995
		US 5679700 A	21-10-1997
FR 2676059 A	06-11-1992	DE 4214328 A	05-11-1992
		JP 5163287 A	29-06-1993
		US 5500414 A	19-03-1996

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No
PCT/FR 93/00093

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C07F9/30 A61K31/66 C07F9/572 C07F9/6558 A61P35/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07F A61K A61P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO 98 03516 A (PFIZER INC.) 29 janvier 1998 (1998-01-29) le document en entier	1-18
Y	WO 93 14112 A (MERCK & CO., INC.) 22 juillet 1993 (1993-07-22) le document en entier	1-18
A	FR 2 676 059 A (COMMISSARIAT À L'ÉNERGIE ATOMIQUE) 6 novembre 1992 (1992-11-06) cité dans la demande	1-18
	—/—	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

12 avril 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

03/05/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Beslier, L

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	GOULET J L ET AL: "Inhibition of stromelysin-1 (MMP-3) by peptidyl phosphinic acids" BIOORG. MED. CHEM. LETT. (BMCLE8,0960894X);1994; VOL.4 (10); PP.1221-4, XP002117546 Merck Res.;Dep. Med. Chem. Res.; Rahway; 07064-0900; NJ; USA (US) cité dans la demande le document en entier	1-18
P,X	VASSILIOU S. ET AL.: "Phosphinic pseudo-tripeptides as potent inhibitors of matrix metalloproteinases: a structure-activity study" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY., vol. 42, no. 14, - 15 juillet 1999 (1999-07-15) pages 2610-2620, XP002135494 AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. WASHINGTON., US ISSN: 0022-2623 le document en entier	1-18

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de la famille de brevets

Dem. Internationale No

PCT/FR 00093

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9803516 A	29-01-1998	AP 761 A	13-09-1999
		AU 712973 B	18-11-1999
		AU 3104297 A	10-02-1998
		BG 103111 A	30-11-1999
		CN 1225639 A	11-08-1999
		CZ 9900118 A	17-11-1999
		EP 0923585 A	23-06-1999
		HR 970391 A	31-08-1998
		JP 11514673 T	14-12-1999
		NO 990184 A	15-03-1999
		PL 331254 A	05-07-1999
WO 9314112 A	22-07-1993	AU 3475393 A	03-08-1993
		CA 2126687 A	22-07-1993
		EP 0623143 A	09-11-1994
		JP 7503016 T	30-03-1995
		US 5679700 A	21-10-1997
FR 2676059 A	06-11-1992	DE 4214328 A	05-11-1992
		JP 5163287 A	29-06-1993
		US 5500414 A	19-03-1996

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (juillet 1992)



•
•
•